

安全性未審査の遺伝子組換えパパイヤにおける検査法の妥当性の確認

佐藤 真耶 鳥居 潤 宇野 玲子

Validation of the Detection Method of Unapproved Genetically Modified Papaya

Maya SATO Jun TORII Reiko UNO

要 旨

パパイヤは国内での収穫量が少なく、消費量の多くを輸入に頼っているため、国内での安全性が確認されていない遺伝子組換え品が流通する可能性が想定される。そこで、国内で流通している生鮮パパイヤ及びその加工品（缶詰、シロップ漬け、しょうゆ漬け、みそ漬け、乾燥パパイヤ、ドライフルーツ、茶及びジャム）を対象に、厚生労働省通知（厚生労働省健康・生活衛生局長通知、令和6年3月28日、健生発0328第1号）に準拠し、パパイヤの組換え遺伝子（PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN）検査法の当研究所における妥当性を確認した。その結果、生鮮パパイヤ及びその加工品（ドライフルーツ及びジャムを除く）については当研究所でも検査が可能であると評価できた。さらに、この方法を用いて検査したところ、いずれの検体からも組換え遺伝子は検出されなかった。しかし、ドライフルーツ及びジャムではパパイヤ遺伝子を検出できなかった。その原因として糖の影響を考えたが、ショ糖による阻害は認められなかった。さらに、ドライフルーツは、保存料として使用されていた亜硫酸ナトリウムの影響を確認したところ、DNA濃度の低下が認められた。製造加工におけるDNA損失が推察されたものの、亜硫酸ナトリウムの添加濃度による差異は認められなかった。また、ジャムは、遺伝子増幅時にPCR阻害物質の働きを抑制する試薬を用いることで検査が可能となることが示唆された。

キーワード：遺伝子組換えパパイヤ、糖類、亜硫酸ナトリウム、PCR阻害物質

Keywords：Genetically modified papaya, Sugar, Sodium sulfite, PCR inhibitors

はじめに

日本は食料自給率が低いものの、食のグローバル化が進み、消費者ニーズの多様化で様々な食品が加工され、流通している。また、近年、植物病害虫の被害や世界的な人口増加等を背景に食品の安定的な供給が求められており、遺伝子組換え食品の需要が高まっている。国内で遺伝子組換え食品の流通が認められている作物の一つでもあるパパイヤは、国内の収穫量が少なく、生鮮で年間約1000トン輸入されている。一方、海外では様々な遺伝子組換え品が開発され、栽培の許可が下りて流通している。パパイヤは生鮮以外にも缶詰やドライフルーツなど様々な加工品が存在し、それらのうち日本で安全性が確認されていない遺伝子組換え品が、誤って国内で流通することが危惧される。そこで、違反食品の流通防止及び監視を目的として生鮮パパイヤ及びその加工品を対象に、厚生労働省通知（厚生労働省健康・生活衛生局長通知、令和6年3月28日、健生発0328第1号）（以下、「通知法」という。）に準拠した安全性未審査である遺伝子組換えパパイヤの検査について、当研究所における妥当性を確認した。

材料と方法

1. 当研究所における妥当性の確認

1-1. 材 料

検体は、国内で流通する生鮮パパイヤ（青及び黄）及びその加工品（缶詰、シロップ漬け、しょうゆ漬け、みそ漬け、乾燥パパイヤ、ドライフルーツ、茶（乾燥葉）及びジャム）の合計10種類をインターネット通販サイトより入手した。パパイヤ加工品の主要な原材料を表1に示す。

表1. パパイヤ加工品の主な原材料

試験品の種類	パパイヤ以外の主な原材料
缶詰	砂糖、酸味料、塩化カルシウム
シロップ漬け	濃縮果汁、香料
しょうゆ漬け	しょうゆ、砂糖、ソルビン酸カリウム
みそ漬け	みそ、砂糖、塩
乾燥パパイヤ	-
ドライフルーツ	砂糖、亜硫酸塩
茶(乾燥葉)	-
ジャム	砂糖、レモン、水飴

1-2. DNAの抽出精製

DNAの抽出精製は通知法に準拠し、QIAGEN Genomic-tip 100/G（QIAGEN N.V.）（以下、「カラム」という。）を用いた陰イオン交換樹脂タイプキット法を採用した。すなわち、粉碎均質化した検体に通知法に指定の緩衝液やRNase A、cellulase、Proteinase K等の酵素を加え抽出した後に、カラム及びエタノール沈殿によりDNA試料原液を精製した。

(令和6年12月20日受理)

1-3. DNA の濃度及び純度の測定

DNA の濃度及び純度の測定には Nano Drop 2000c (サーモフィッシャーサイエンティフィック (株)) を使用した。A260 が 1 のときを 50 ng/μL として換算した DNA 試料原液を滅菌蒸留水で 10 ng/μL に希釈したものを DNA 試料液とした。なお、DNA 試料原液の濃度及び純度の目標値は、濃度を 10 ng/μL 以上、純度を A260/A280 比 1.7～2.0 とした。

1-4. リアルタイム PCR

プライマーとプローブの塩基配列、PCR 用反応液の調製方法及びリアルタイム PCR 反応条件は通知法に準拠し、リアルタイム PCR 用マスターミックスは FastGene™ QPCR Probe Mastermix w/ROX (日本ジェネティクス (株))、リアルタイム PCR 装置は LightCycler 480 System II (ロシュ・ダイアグノスティックス (株)) を使用した。

1-5. 結果の判定

リアルタイム PCR での結果の判定は、通知法に準拠した。すなわち、当該遺伝子の増幅の確認は、Amplification plot 上での指数関数的な増幅曲線、43 未満の Cq 値及び multicomponent 上での対象色素由来の蛍光強度の指数関数的な明確な増加の確認をもって行い、組換え遺伝子 (PRSV-YK、PRSV-SC、PRSV-HN) 検知試験及び CaM 配列検知試験の両試験で当該遺伝子の増幅が確認された場合には、陽性と判定した。また、パパイヤ遺伝子の増幅が確認できない場合には、検知不能と判定した。

2. PCR 阻害物質の抑制剤による検討

PCR 阻害物質の影響を抑制する試薬として Ampdirect Plus ((株) 島津製作所) を用いて、ドライフルーツ、ジャム及び対照検体として缶詰の DNA 試料液で PCR と電気泳動を行った。PCR 用反応液の調製は、BIOTAQ HS DNA Polymerase (Meridian Bioscience Inc.) 0.1 μL、パパイヤ遺伝子のプライマー溶液 (各 10 μmol/L) 各 1 μL、2 × Ampdirect Plus 10 μL を混合し、DNA 試料液 0.5 μL を添加後、滅菌蒸留水で全量 20 μL とした。また、対照として、DNA 試料液の代わりに滅菌蒸留水と GM パパイヤ系統別 DNA PRSV HN 陽性コントロールプラスミドを用いた検体及び対象プライマーの代わりに滅菌蒸留水を用いた検体を調製した。PCR 反応条件は、初期変性を 95℃、10 分、増幅反応を 94℃、30 秒熱変性と 72℃、1 分アニーリング及び伸長反応 45 サイクルとした。電気泳動はミドリグリーン Advance アガロースタブレット (日本ジェネティクス (株)) を 50 倍希釈した 50 × TAE ((株) ニッポン・ジーン) で溶解し、作成した 3%ゲルを用いた。

結 果

1. 当研究所における妥当性の確認

生鮮パパイヤ及びその加工品について、通知法に準拠して DNA の抽出精製を行い DNA の濃度と純度を調べたところ、

表 2 に示すとおり、生鮮パパイヤ (青及び黄)、しょうゆ漬け、みそ漬け、乾燥パパイヤ及び茶で 10 ng/μL 以上の十分な濃度と A260/A280 比 1.7～2.0 の十分な純度の DNA が抽出できた。一方、缶詰、シロップ漬け、ドライフルーツ及びジャムでは、十分な濃度と純度の DNA を抽出できなかった。抽出精製法の改良については α-Amylase の添加¹⁾ や採取量の変更²⁾ が報告されているが、それらによる改善は認められなかった。

表 2. 生鮮パパイヤ及びその加工品から抽出した DNA の濃度と純度

試験品の種類	DNA濃度 (ng/μL)	DNA純度 (A260/A280比)
	目標値: 10ng/μL以上	目標値: 1.7～2.0
生鮮青パパイヤ	263.6 / 158.6	1.84 / 1.84
生鮮黄パパイヤ	61.3 / 65.1	1.87 / 1.85
缶詰	0.5 / 1.2	3.00 / 1.53
シロップ漬け	5.4 / 2.9	2.16 / 2.04
しょうゆ漬け	33.6 / 21.8	1.86 / 1.87
みそ漬け	169.2 / 102.7	1.80 / 1.77
乾燥パパイヤ	56.1 / 58.8	1.82 / 1.85
ドライフルーツ	0.5 / 0.6	1.11 / 5.50
茶 (乾燥葉)	413.1 / 473.4	1.79 / 1.78
ジャム	4.1 / 11.1	1.19 / 1.59

検討は2併行で実施し、抽出したDNAの濃度又は純度で目標値を満たさなかったものを下線で示した。

抽出した DNA についてリアルタイム PCR を行ったところ、表 3 に示すとおり、生鮮パパイヤ (青及び黄)、缶詰、シロップ漬け、しょうゆ漬け、みそ漬け、乾燥パパイヤ及び茶からはリアルタイム PCR でパパイヤ遺伝子が検出でき、いずれの検体からも組換え遺伝子は検出されなかった。また、ドライフルーツ及びジャムはパパイヤ遺伝子を検出できず、検知不能となった。

表 3. 生鮮パパイヤ及びその加工品の組換え遺伝子判定結果 (2 併行で実施)

試験品の種類	パパイヤ 陽性対照試験のCq値	組換え遺伝子 検知試験*のCq値	判定
生鮮青パパイヤ	20.50 / 20.53	(-)	陰性
	20.55 / 20.51	(-)	
生鮮黄パパイヤ	21.02 / 21.01	(-)	陰性
	21.03 / 21.05	(-)	
缶詰	31.23 / 31.29	(-)	陰性
	31.02 / 30.98	(-)	
シロップ漬け	27.57 / 27.11	(-)	陰性
	26.60 / 26.59	(-)	
しょうゆ漬け	20.22 / 20.47	(-)	陰性
	22.47 / 21.92	(-)	
みそ漬け	23.45 / 23.42	(-)	陰性
	23.43 / 23.32	(-)	
乾燥パパイヤ	21.70 / 21.77	(-)	陰性
	21.32 / 21.44	(-)	
ドライフルーツ	(-) / (-)	(-)	検知不能
	(-) / (-)	(-)	
茶 (乾燥葉)	21.31 / 21.24	(-)	陰性
	21.29 / 21.14	(-)	
ジャム	(-) / (-)	(-)	検知不能
	(-) / (-)	(-)	

* PRSV-YK検知試験、PRSV-SC検知試験、PRSV-HN検知試験、CaM配列検知試験

2. 検査法改善のための検討

2-1. ショ糖添加による DNA 濃度への影響

DNA 濃度の低い検体に共通して含有量の多い糖の影響を調べるため、パパイヤ加工品に糖として一般的によく用いら

れるショ糖を、生鮮パパイヤ（黄）に50%（w/w）程度添加してDNAの抽出精製を行った。その結果、ショ糖を添加した検体のDNA濃度は無添加検体の98.4%となり、DNA濃度に差異は認められなかった。

2-2. カラム精製以降の操作における検体の違いによるDNA濃度への影響

缶詰、シロップ漬け、ドライフルーツ及びジャムでDNA濃度が低くなった原因として、各加工品に含まれる成分によってカラムによる精製以降の操作で生じた可能性を考え、DNA濃度の低い缶詰、シロップ漬け、ドライフルーツ及びジャムの未精製の上清25 mLに、パパイヤ加工品（茶）から前述の方法により抽出したDNA試料原液（691.8 ng/μL）を20 μL添加し、一晚静置したものをカラムへ負荷し、カラムによる精製以降の操作を行った。また、滅菌蒸留水にDNA試料原液（茶）を添加し、同様に操作を行ったものを対照検体とした。その結果、缶詰、シロップ漬け、ドライフルーツ及びジャムのDNA濃度は、それぞれ対照検体の73.7%、93.2%、89.0%及び108.6%であった。

2-3. 亜硫酸ナトリウム添加によるDNA濃度への影響

ドライフルーツに漂白剤として使用されている亜硫酸について、DNA抽出への影響を調べるため、生鮮パパイヤ（黄）に亜硫酸ナトリウム（富士フィルム和光純薬（株））を食品衛生法の使用基準（二酸化硫黄として2.0 g/kg以上残存しない）と同程度を添加し、冷蔵条件下で30日程度保管した後に、DNAの抽出精製以降の操作を行った。その結果、DNA濃度は無添加検体の65.6%となり、低下が認められた。また、使用基準の10倍と70倍を添加した場合には、それぞれ無添加検体の57.3%と63.4%となり、亜硫酸ナトリウムの添加量に依存したDNA濃度の低下は認められなかった。なお、各検体のpHを測定したところ、無添加検体で4.5、亜硫酸ナトリウムを使用基準と同程度添加した検体で5.5、使用基準の10倍と70倍では、それぞれ7.5と8.5であった。

2-4. PCR阻害物質による影響

DNAポリメラーゼなどに吸着する電荷物質を中和することでPCR阻害物質の影響を抑制するAmpdirect Plusを用いて、前述の結果（表3）でパパイヤ遺伝子を検知できなかったドライフルーツ及びジャムについてPCRと電気泳動を行ったところ、図1に示すとおり、ジャムと対照検体（缶詰）は、パパイヤ遺伝子の増幅バンドが認められた。また、増幅後のDNA試料液で通知法に準拠したリアルタイムPCRを行ったところ、ジャムでも対照検体（缶詰）と同様にパパイヤ遺伝子を検出できた。検討したパパイヤ遺伝子の検出状況は表4に示す。

考 察

1. 当研究所における妥当性の確認

本検証で調べた検体のうち、生鮮パパイヤ及びその加工品

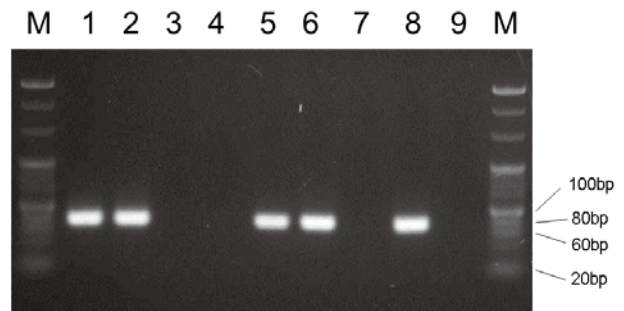


図1. パパイヤ加工品のAmpdirect Plusによる遺伝子増幅結果

1, 2: 缶詰（対照検体）、3, 4: ドライフルーツ、5, 6: ジャム、7: 滅菌蒸留水（DNA試料液代用）、8: 陽性コントロール、9: 滅菌蒸留水（プライマー代用）

表4. パパイヤ加工品におけるパパイヤ遺伝子の検出状況

試験品の種類	DNA濃度 (10ng/μL以上)	パパイヤ遺伝子の増幅		
		リアルタイムPCR	Ampdirect Plus使用 PCRと電気泳動	PCRで増幅後に リアルタイムPCR
ドライフルーツ	×	×	×	×
ジャム	×	×	○	○
缶詰（対照検体）	×	○	○	○

○: 検出 ×: 不検出

（しょうゆ漬け、みそ漬け、乾燥パパイヤ及び茶）はDNAの抽出精製で得られたDNAの濃度及び純度が目標値を満たした。リアルタイムPCRでもパパイヤ遺伝子を検知できたことから、本検査法を妥当であると評価した。

パパイヤ加工品のうち缶詰とシロップ漬けは、DNAの濃度及び純度が目標値を満たさなかったものの、パパイヤ遺伝子の検出は2併行間でも再現性が良く、リアルタイムPCRの結果に問題はなかったことから、検知は可能だと考えられた。また、ドライフルーツ及びジャムはパパイヤ遺伝子を検出できず、検知不能となった。缶詰及びシロップ漬けで検知可能な理由として、DNA純度が悪いことからDNA濃度が正しく測れておらず、実際には測定値よりも濃い濃度であった可能性がある。しかし、リアルタイムPCRの結果でDNAの濃度及び純度が良好な検体（DNA試料液: 10 ng/μL）のCq値が20～23であるのに対し、缶詰及びシロップ漬け（DNA試料原液: 未希釈）は26～31と高くなった。Cq値はDNA量が少ない程、値が大きくなることから、Cq値が高い缶詰及びシロップ漬けはDNA濃度が10 ng/μLよりも低いことが推定される。

2. 検査法改善のための検討

抽出したDNAの濃度及び純度が目標値を満たさなかった検体について検討を行った結果、ショ糖添加によるDNA抽出阻害及びカラム精製以降の操作におけるDNA濃度の低下は認められなかった。このことから、検体に含まれるDNAは、製造過程の熱処理、乾燥及び酵素処理等において損失していたことが濃度低下の原因として考えられた。

また、亜硫酸によるDNA抽出への影響を調べたところ、亜硫酸ナトリウムの食品衛生法の使用基準と同程度の添加により、DNA濃度は無添加時の6割程度まで低下したが、亜硫酸ナトリウムの添加量に依存したDNA濃度の低下は認められなかった。大森らの報告³⁾でも亜硫酸で処理され

たパパイヤドライフルーツからのパパイヤ遺伝子の検出率が低いことが知られており、今回の結果は、亜硫酸により pH5 付近でシトシンの脱アミノ化や pH7 付近でシチジンのグリコシド結合の切断が起こりやすい⁴⁾ という報告とも一致する。亜硫酸ナトリウムの添加量に依存する差異が認められなかった要因として、亜硫酸ナトリウム添加後の検体をチャック付きポリ袋に密封して保存したため、亜硫酸による DNA 損傷に大きく寄与する酸素⁴⁾ を十分に供給できていなかったことが考えられる。

PCR を阻害する電荷物質への中和作用がある Ampdirect Plus を用いることでパパイヤ遺伝子の増幅が可能となった。DNA ポリメラーゼ活性を阻害する要因としてフラボノイドやテルペノイドなど様々な物質が知られており⁵⁾、ジャムでパパイヤ遺伝子を検出できなかった原因は、これらの阻害物質によるものと考えられた。

今後は、府内におけるパパイヤの流通量や消費量の動向を注視し、それに応じて検査可能な加工品の種類の拡充を考えたい。

引用文献

- 1) 村上恭子, 河田和利. 2008. 市販キットを用いた小麦加工品からの簡便迅速な DNA 抽出法. 香川県農業試験場研究報告, 59, 45-49
- 2) 村上太郎, 村野晃一, 工藤鮎子, 山口之彦, 山野哲夫. 2020. 遺伝子組換えばれいしょ検出におけるばれいしょ加工品の DNA 抽出法の改良. 大阪健康安全基盤研究所研究年報, 4, 54-60
- 3) 大森清美, 赤星千絵, 佐藤英子, 真野潤一, 近藤一成, 穂山浩, 中村公亮. 2021. 亜硫酸塩が添加され加工されたパパイヤ, トマト, リンゴ, バナナドライフルーツからの DNA の検出可能性について. 日本食品化学学会誌, 28 (3), 107-116
- 4) 早津彦哉. 1974. 核酸と亜硫酸. ファルマシア, 10 (6), 401-403
- 5) 水品善之, 菅原二三男, 坂口謙吾. 2000. 長鎖脂肪酸はどのように哺乳動物 DNA ポリメラーゼ β を阻害するか. 化学と生物, 38 (10), 684-692